

# Stroma-hám interakciók a vastagbél regenerációs és tumorképződési folyamataiban

Doktori tézisek

**Valcz Gábor**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, a MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Zalatnai Attila, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Tóth Erika, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona, a MTA doktora, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szaleczky Erika, Ph.D., szakorvos  
Dr. Szmola Richárd, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Budapest

2012

## BEVEZETÉS

A vastagbél patológiás folyamataiban, mint például a gyulladást követő gyógyulás és a vastagbélrák (colorectalis carcinoma/CRC) kialakulása, alapvetőek az ún. stroma-hám interakciók. Ezek a folyamatok magukban foglalják a sejtváándorlással és fenotípus változással járó, valamint a szabályozó molekulák mozgásával járó folyamatokat.

A vastagbél hámregenerációs folyamataiban a szöveti (lokális) őssejteken kívül a csontvelői eredetű őssejtek is részt vesznek. Feltételezhetően, ezen sejtek vándorlásának köztes állomásai a nyiroksejt aggregátumok, ahonnan a csontvelői őssejtek tovább vándorolva kötőszöveti sejté (pl. fibroblaszt, miofibroblaszt) alakulnak, vagy a mesenchymális - epitheliális átalakulás révén a vastagbél hámrétegébe épülve segíthetik annak gyógyulását. A csontvelői őssejtek a kötőszöveti vándorlásuk során, a nyomásviszonyok megváltozásának és különböző szövetspecifikus szabályozómolekulák hatására részlegesen elköteleződnek hámsejt irányba. A szakirodalom nem tér ki a csontvelői őssejt vándorlás és a korai elköteleződés, valamint a nyiroksejt aggregátumok kapcsolatára a hámregenerációs folyamatokban.

A vastagbélrák kialakulása során jellemző sejtfenotípus változással járó folyamat az epitheliális - mesenchymális átalakulás (epithelial to mesenchymal transition/EMT). Az EMT során a hámsejtek elveszítik hám-szerű tulajdonságaikat (pl. hasáb sejthalak, apikális - bazális sejtpolaritás, cytokeratin termelés) és a mesenchymális sejtek tulajdonságait veszik fel (pl. alfa-simaizom aktin termelés, orsó-sejthalak és a mozgékonyság megjelenése). Az EMT szerepet játszik a rákos őssejtek szaporodási tulajdonságainak szabályozásában azáltal, hogy a hámsejtekből származó mesenchymális sejtek a rákos őssejt abnormális mikrokörnyezetének alkotói lehetnek. Az EMT folyamata döntően a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ /TGF- $\beta$ ) receptor II (TGF- $\beta$ RII) és/vagy Toll-like receptor 9 (TLR9) aktiváción keresztül megy végbe. Ez utóbbi esetben a receptort metilálatlan CpG szigeteket tartalmazó DNS darabok is aktiválhatják, amelyek mennyisége a vastagbélrákos páciensek plazmájában nagymértékben megnövekszik. A hámsejtek szabályozómolekula termelése ugyancsak szerepet játszhat a rákos mikrokörnyezet kialakításában azáltal, hogy a normális sejtarányokat megváltoztatva az aktív hámsejtosztódást befolyásoló sejtípusok (pl. miofibroblasztok) számát növeli. Ezekben a folyamatokban elsődleges lehet a hámsejtek TGF- $\beta$  és osteopontin (OPN) termelése. A tudományos irodalomban nem található

egyértelmű adat arra nézve, hogy miként változik az epitheliális - mesenchymális átalakulások aránya, valamint az ezt szabályozó TGF- $\beta$ RII és Toll-like receptor 9 expressziója a vastagbél adenoma - carcinoma szekvenciája (ACS) során.

## CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a vastagbél nyálkahártya hámrétegében végbemenő sejtfenotípus változásokat és egyes, vélhetően a rákos összejt mikrokörnyezetét befolyásoló fehérje expressziós változásait figyeltem meg.

Célkitűzéseimet az alábbi négy pontban foglaltam össze:

1. A csontvelői eredetű sejtek és a nyiroksejt aggregátumok a vastagbél hámregenerációs folyamataiban betöltött szerepének vizsgálata.
2. A csontvelői eredetű összejtek korai (a stromális vándorlás során kialakuló), hámirányú elköteleződésének kimutatása CDX2 hám marker és Musashi-1 összejt marker segítségével.
3. A hámrétegben végbemenő sejtátalakulási folyamatok arányának meghatározása  $\alpha$ -simaizom aktin (miofibroblaszt marker) és cytokeratin (hám marker) segítségével a vastagbél adenoma - carcinoma szekvencia során.
4. A sejtátalakulási folyamatokat befolyásoló fehérjék (TGF- $\beta$ RII, TLR9 és OPN) expresszió változásának vizsgálata az adenoma - carcinoma szekvencia során.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataimat a II. sz. Belgyógyászati Klinika Sejtanalitika Laboratóriumában végeztem. A csontvelői őssejtek hámba épülésének vizsgálatakor, a férfi csontvelővel transzplantált nőbetegekből származó mintákat használtunk fel (egészséges n=5, aspecifikus gyulladást mutató n=5).

A mintákon *fluoreszcens in situ hibridizáció*s (FISH) jelölést végeztünk az X- és Y-kromoszómák centromerájára specifikus alfa-szatellita próbakeverékkel, majd a metszeteket digitálisan archiváltuk. Ezután a fedőlemezt eltávolítottuk és cytokeratin hám marker, valamint CD45 lymphocita specifikus ellenanyagok segítségével azonosítottuk a csontvelői eredetű (XY-FISH+), CD45 negatív sejteket. A tárgylemez ismételt szkennelését követően lehetővé vált a két digitális metszet párhuzamos kiértékelése virtuális mikroszkóp segítségével. A sejtek korai, hám irányú elköteleződésének kimutatására CDX2 hámsejt specifikus és Musashi-1 őssejt marker ellenanyagokat használtunk, amelyeket kettős fluoreszcens immunhisztokémiai jelöléssel tettünk láthatóvá.

Az epitheliális - mesenchymális átalakulása kimutatása a vastagbélrák fejlődésének különböző szövettani stádiumaiban került sor (egészséges n=8, low grade adenoma n=8, vastagbélrák n=8). A sejtátalakulási folyamat kimutatásához anti- $\alpha$ -simaizom aktin ( $\alpha$ -SMA) és anti-cytokeratin elsődleges ellenanyagokat használtunk, amelyeket kettős fluoreszcens festéssel tettünk láthatóvá. Az átalakulási folyamatokban résztvevő, osztódó, a hámrétegben elhelyezkedő sejteket Ki-67 proliferációs marker és  $\alpha$ -SMA kettős fluoreszcens festéssel azonosítottuk. A metszeteket minden esetben digitálisan archiváltuk. A sejtek pontos arányát a digitális mikroszkópba épített „marker counter” modul segítségével határoztuk meg.

Az E-cadherin és az osteopontin immunhisztokémiai kimutatását hagyományos, átmenőfényes metszeteken végeztük el, és szemikvantitatív módon egy pontozási rendszer (ún. scorolási séma) alkalmazásával, digitális mikroszkóppal értékeltük.

A Toll-like receptor 9 kimutatását szintén hagyományos, átmenőfényes immunhisztokémiai módszerrel végeztük el. A digitális mikroszkóp segítségével pontosan megadtuk a pozitív és a negatív sejtek egymáshoz viszonyított arányát. A TGF $\beta$ RII fehérje szintű expressziós változását microarray chiptechnika segítségével mRNS szinten is vizsgáltuk.

	<b>XY-FISH, CD45/CK fehérje</b>	<b><math>\alpha</math>-SMA/CK fehérje</b>	<b>E-cadherin fehérje</b>	<b>TGF<math>\beta</math>RII fehérje</b>	<b>TGF<math>\beta</math>RII mRNS</b>	<b>TLR9 fehérje</b>	<b>OPN fehérje</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>13</b>
<b>Gy</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Ad</b>	<b>-</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>13</b>
<b>CRC</b>	<b>-</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>13</b>

**A kísérletekben felhasznált, az egyes szövettani állapotokhoz tartozó mintaszám.**

A kromoszómák kimutatása XY-FISH-módszerrel, a fehérjék kimutatása immunhisztokémiai módszerrel, az mRNS expresszió mérése microarray chiptechnika segítségével történt. Szövettani állapotok: N: normális, Gy: aspecifikus gyulladást mutató, Ad: adenoma, CRC: vastagbélrák.

## EREDMÉNYEK

### CD45-, Y-FISH+ sejtek a vastagbél hámrétegében

Szignifikáns különbséget ( $p < 0.01$ ) találtam a nyiroksejt aggregátumokat körülvevő kripták intraepitheliális CD45-, Y-FISH+ sejtarányában ( $1.0685 \pm 0.240\%$ ), összehasonlítva az egészséges ( $0.018 \pm 0.017\%$ ) és a diffúz gyulladást mutató területek ( $0.043 \pm 0.005\%$ ) hasonló sejteivel.

### A stromális sejtek CDX2 és Musashi-1 expressziója

Vizsgálataink során a stromában jól látható CDX2 hám marker pozitivitást mutató sejteket találtam, amelyek nem voltak kapcsolatban a kriptákkal. Ezen sejtek kis hányada Y kromoszómákat hordozott (Y-FISH pozitivitást mutatott). A stromában található CDX2 pozitív sejtek egy része Musashi-1 összejt markerre is pozitívnak bizonyult.

### Intraepitheliális $\alpha$ -SMA pozitív sejtek arányának változása az ACS során

A vastagbél hámrétegében található, miofibroblaszt-szerű átalakulást mutató CK+ sejtekben többnyire a magban, vagy a maghoz közeli, pontszerű  $\alpha$ -SMA expresszió volt megfigyelhető. Diffúz, sejtplazma festődés ritkán volt látható. Az intraepitheliális  $\alpha$ -SMA+/CK+ sejtek aránya szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) megnövekedett a CRC mintákban ( $3.34 \pm 1.01\%$ ), összehasonlítva az egészséges ( $1.94 \pm 0.69\%$ ) és az adenomás mintákkal ( $1.62 \pm 0.78\%$ ). Az intraepitheliális sejtek 81.4 - 88%-a volt osztódási fázisban (Ki-67 pozitivitást mutatott).

### Az E-cadherin termelődésének változása az ACS során

Az E-cadherin expressziója folyamatos csökkenést mutatott az ACS során. A szemikvantitatív kiértékelés során a szövettanilag ép mintákban erős membrán és citoplazma festődést találtunk (a jellemző score érték: +2). Adenómában mind a membrán, mind a citoplazma festődés csökkent, az egészséges mintákhoz viszonyítva (a jellemző score érték: 1 vagy 0). A

vastagbélrákos minták nem mutattak citoplazma festődést, a membrán festődése gyenge volt, néha eltűnt (fragmentált festődés) (jellemző score érték: -2).

#### A TGF- $\beta$ receptor II fehérje expresszió változása az ACS során

A normális minták hámjában sejtmembrán és citoplazmatikus TGF- $\beta$ RII fehérje termelés is kimutatható volt (jellemző score érték 0 és +1). Adenomában a citoplazmális TGF- $\beta$ RII expresszió a sejtek apikális felére korlátozódott, esetenként hiányzott, a membrán festődése gyenge, szakadozott volt, ritkán teljesen el is tűnt (jellemző score érték: -2). Vastagbélrákban a normális hámnál erősebb citoplazma- és membránfestődés volt megfigyelhető (jellemző score érték +2).

#### A TGF- $\beta$ receptor II mRNS szintű expressziós változása az ACS során

A független mintákon elvégzett microarray vizsgálatok eredménye szerint az adenomában és a vastagbélrákos mintákban emelkedett szintű TGF- $\beta$ RII mRNS termelés volt megfigyelhető a normális mintákhoz képest. Az egészséges és a vastagbélrákos, valamint az egészséges és az adenoma minták között is szignifikáns különbség volt megfigyelhető ( $p < 0.05$ ).

#### Az OPN termelődésének változása a vastagbél ACS során.

A vastagbélrák kialakulásának minden szövettani stádiumában az OPN expresszió a háms sejtek sejtplazmájára korlátozódott, a magban nem találtunk kimutatható immunreakciót. Egészséges mintákban gyenge, diffúz citoplazma expressziót észleltünk. Adenomában mérsékelt, míg a vastagbélrákban erős citoplazmatikus OPN expresszió volt megfigyelhető.



## KÖVETKEZTETÉSEK

- A csontvelői őssejtek hámba épülése nem túl gyakori folyamat, még enyhe gyulladás esetén sem, a hámban ritkán szaporodnak, többnyire egyesével helyezkednek el.
- A lymphoid aggregatumok részt vehetnek a vastagbélhám regenerációs folyamataiban, mint a csontvelői eredetű őssejtek bevándorlásának köztes állomásai.
- A csontvelői eredetű őssejtek viszonylag korán, már a kötőszöveti rétegben való vándorlaskor elkeleleződnek hámsejt irányba, amit a CDX2 hám marker megjelenése alátámaszt. Ez az elkeleleződés valószínűleg a mikrokörnyezet megváltozott nyomásviszonyainak és szabályozó-molekula összetételének eredménye.
- A sejtátalakulási folyamatok már az egészséges vastagbélhámiban is megjelennek, arányuk azonban a vastagbélrákban megnő. Az ilyen sejtátalakulási folyamatokra legtöbbször pontszerű, a magban vagy a mag közelében elhelyezkedő  $\alpha$ -simaizom aktin expresszió jellemző. A citoplazmában a diffúz  $\alpha$ -simaizom aktin termelődés sokkal ritkábban látható. A kezdeti fázisban (a hámréteg elhagyása) az epitheliális - mesenchymális átalakulás nem igényel  $\alpha$ -simaizom aktinhoz kötött aktív sejtmozgást. Feltételezésünk szerint a fokozott proliferáció következtében a hámrétegben megnövekedő nyomásnak nagyobb szerepe van ezen sejtek kötőszöveti rétegbe juttatásában.
- A pontszerű, magban elhelyezkedő  $\alpha$ -SMA expresszió, kezdődő epitheliális - mesenchymális átalakulásra utal, amely a mag morfológiájának megváltozásával újabb átírási folyamatokat indíthat el (ún. mechanotransductios folyamat).
- A vastagbélhámiban elhelyezkedő  $\alpha$ -SMA pozitivitást mutató sejtek nagy része osztódási fázisban van, amit a Ki-67 pozitivitás is alátámaszt.
- A TGF- $\beta$  receptor II fehérje termelődése párhuzamosan változik a sejtátalakulási folyamatok gyakoriságával, ami újabb bizonyítéka annak, hogy az EMT fő szabályozója a TGF $\beta$ RII.
- A TLR9 receptorok fokozott termelődése már az adenomában megfigyelhető, ám ezt nem követi az intraepitheliális  $\alpha$ -SMA sejtarány növekedése, amelynek az lehet az oka, hogy nem jelennek meg azok a CpG szigeteken gazdag DNS lánc darabok (mint ligandok), amelyek a vastagbél-tumorokban aktiválhatják ezeket a receptorokat.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám során szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:

- Prof. Dr. Tulassay Zsolt akadémikusnak és Prof. Dr. Rácz Károlynak, hogy lehetővé tették számomra a kísérletek elvégzését; Tulassay Professzor úrnak külön hálás vagyok útmutatásáért, melynek segítségével törekedtem elsajátítani a magyar nyelvű közlemények elkészítésének fortélyait;
- Témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, akinek áldozatos segítőkészsége és támogatása által elsajátíthattam a helyes kutatói szemléletmódot;
- Dr. Sipos Ferencnek, aki mindig pontos, precíz tudásra nevelt és akinek révén megismerhettem a publikálás szabályait;
- Dr. Krenács Tibornak, aki bevezetett a szövettan és az immunhisztokémia cseppet sem egyszerű világába;
- Kónyáné Farkas Gabriella szakasszisztensnek, hogy gyakorlati munkám során értékes segítséget nyújtott;
- Prof. Dr. Masszi Tamás egyetemi tanárnak és Dr. Hagymási Krisztinának a csontvelőtranszplantált betegek vizsgálatában nyújtott segítségükért;
- Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségükért;
- Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának és Kalmár Alexandrának a chip elemzésben nyújtott segítségéért;
- Balogh Zsófiának és Csizmadia Annamáriának az ivari kromoszómák kimutatásában nyújtott segítségükért;
- Dr. Tóth Kingának, Dr. Leiszter Katalinnak, Dr. Patai Árpádnak, valamint Berczik Máriának támogatásukért és barátságukért;
- A Sejtanalitikai Laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak támogatásukért;
- Dr. Tóth Erikának, Dr. Zalatnai Attilának, Dr. Müllner Katalinnak és Dr. Igaz Péternek dolgozatom alapos áttekintéséért, javaslataikért és szakmai bírálatukért;

- Végül, de legkevésbé sem utolsó sorban Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy megteremtették azt az erkölcsi és anyagi alapot, amely nélkül munkámat nem végezhettem volna el.

## KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### A Ph.D. témához kapcsolódó elsőszerzős, angol nyelvű közlemények

1. **Valcz G**, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z: Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. J Clin Pathol. 2011;64:771-5. **IF: 2,42.**
2. **Valcz G**, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z: Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. Pathol Oncol Res. 2010;16:541-5. **IF: 1,48.**
3. **Valcz G**, Krenács T, Sipos F, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Müzes G, Molnár B, Tulassay Z: The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. Pathol Oncol Res. 2011;17:11-6. **IF: 1,48.**
4. **Valcz G**, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z: Increase of  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> and CK<sup>+</sup> cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. Pathol Oncol Res. 2011 (accepted for publication). **IF: 1,48.**

### A Ph.D. témához kapcsolódó társszerzős, angol nyelvű közlemények

1. Sipos F, **Valcz G**, Molnár B: Physiologic and pathologic role of local and immigrating colonic stem cells. World J Gastroenterol. 2011 (accepted for publication). **IF: 2,24.**
2. Sipos F, Müzes G, **Valcz G**, Galamb O, Tóth K, Leiszter K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B: Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol. 2010;45:440-8. **IF: 1,96.**

#### **A Ph.D. témához kapcsolódó elsőszerzős, magyar nyelvű közlemények**

**1.Valcz G**, Krenács T, Sipos F, Wichmann B, Tóth K, Leiszter K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Müzes G, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z: A csontvelői eredetű őssejtek megjelenése az ép vastagbélhamban és a gyulladást követő hámregenerációban. Orv. Hetil. 2009;150:1852-7.

**2. Valcz G**, Krenács T, Molnár B, Tulassay Z: A myofibroblastok szerepe a vastagbél gyulladásos és daganatos folyamataiban. Orv Hetil. 2009;150:597-602.

**3. Valcz G**, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Tóth K, Molnár B, Tulassay Z: Az őssejtek jellemzése, mozgása és terápiás lehetőségei a humán vastagbélben. Magy Belorv Arch. 2009;62:272-8.

#### **A Ph.D. témához nem kapcsolódó társszerzős, angol és magyar nyelvű közlemények**

**1.** Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Tóth K, **Valcz G**, Patai VA, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z: Az öregedés mikroszkópos és molekuláris jelei a vastagbélben, valamint ezek lehetséges szerepe az időskori vastagbélrák kialakulásában. Orv Hetil. 2010;151:885-92.

**2.** Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, **Valcz G**, Kalmár A, Müzes Gy, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z: Az öregedés jelei az emésztőrendszerben. Magy Balorv Arch. 2010;63:19-24.

**3.** Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, **Valcz G**, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z: The Influence of Methylated Septin 9 Gene on RNA and Protein Level in Colorectal Cancer. Pathol Oncol Res. 2011;17:503-9. **IF: 1,48.**

**4.** Janzsó G, **Valcz G**, Thuma A, Szoke B, Lendvai Z, Abrahám H, Kozicz T, Halasy K: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide- immunopositive neuronal elements in the lateral septum: rostrocaudal distribution in the male rat. Brain Res. 2010;1362:40-7. **IF: 2,63.**

**5.** Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, **Valcz G**, Tulassay Z, Molnár B: Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. Br J Cancer. 2010;102:765-73. **IF: 4,83.**

**6.** Galamb O, Sipos F, Spisák S, Galamb B, Krenács T, **Valcz G**, Tulassay Z, Molnár B: Potential biomarkers of colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma progression: mRNA expression profiling and in situ protein detection on TMAs reveal 15 sequentially upregulated and 2 downregulated genes. Cell Oncol. 2009;31:19-29. **IF: 4,17.**

Az elsőszerzős cikkek impakt faktora: 6,86

Összes impakt faktor: 21,99